Aus dem Hygienischen Institut zu Rostock.

Beiträge zur Kenntnis des Ablaufs und der Grösse der durch Mikrococcus ureae liquefaciens bewirkten Harnstoffzersetzung.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doctorwürde

der

medicinischen Facultät zu Rostock,

vorgelegt von

Albrecht Burchard,

approbirtem Arzt aus Todenhagen.

München.

Druck von R. Oldenbourg.

1899.

Aus dem Hygienischen Institut zu Rostock.

Beiträge zur Kenntnis des Ablaufs und der Grösse der durch Mikrococcus ureae liquefaciens bewirkten Harnstoffzersetzung.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doctorwürde

der

medicinischen Facultät zu Rostock,

vorgelegt von

Albrecht Burchard,

approbirtem Arzt aus Todenhagen.

München.

Druck von R. Oldenbourg.

1899.

Wie van Tieghem und Pasteur zuerst ausgesprochen haben, sind als Ursache der ammoniakalischen Harngährung Mikroorganismen anzusehen, die bei ihrem Wachsthum im Harn wie auch in künstlich hergestellten Harnstofflösungen den Harnstoff in kohlensaures Ammoniak umwandeln; die Umwandlung vollzieht sich in der Weise, dass in das Molekül des Harnstoffes zwei Moleküle Wasser aufgenommen und gleichzeitig die Atomgruppirungen geändert werden.

Seitdem haben verschiedene Forscher, namentlich Musculus, v. Jacksch, zuletzt Leube und Graser die ammoniakalische Harngährung näher untersucht. Leube[1]) und Graser insbesondere haben dargethan, dass eine Reihe von Mikroorganismen die Fähigkeit besitzt, den Harnstoff in obiger Weise zu zerlegen. Sie isolirten neben dem schon früher bekannten Mikrococcus ureae eine Stäbchenart Bacterium ureae, welches Harnstoff ebenfalls energisch zerlegte, ferner eine Sarcineart, der die gleiche Fähigkeit zukam. In Flügge's[2]) Laboratorium wurde weiterhin ein die Gelatine verflüssigender Mikrococcus ureae liquefaciens aus zersetztem Harn isolirt, der gleichfalls energisch Harnstoff

1) Leube, Ueber die ammoniakal. Harngärung. Virchow's Archiv, 1885, S. 540 ff.

2) Vgl. Flügge, Die Mikroorganismen, II. Aufl., 1886, S. 160.

vergährte. J. Schnitzler[1]) und Hofmeister[2]), sowie Brodmeier[3]) haben endlich auch für den Proteus vulgaris (Hauser), entgegen den Angaben Leube's, ein kräftiges Harnstoffvergährungsvermögen nachgewiesen. Es scheint hienach, dass die Fähigkeit, Harnstoff zu zerlegen, überhaupt vielen Spaltpilzen eigen ist, wie ich denn auch bei Prüfung einer grösseren Anzahl von Keimen, welche aus dem Leitungswasser in Rostock isolirt wurden, wiederholt die Umwandlung von Harnstoff in Ammoniak und Kohlensäure constatiren konnte, und ebenso Versuche mit Spaltpilzen aus Gartenerde ergaben, dass zahlreiche derselben deutliche Alkalescenz des ursprünglich sauren, harnstoffhaltigen Nährbodens hervorriefen.

Die Intensität der Harnstoffzersetzung war jedoch bei den einzelnen Harnstoff spaltenden Spaltpilzen sehr verschieden, manche verursachten eine sehr intensive, andere eine so schwache Ammoniakbildung, dass der Nährboden erst nach vielen Tagen eine deutlich alkalische Reaction zeigte, und darum darf die Mittheilung von Lehmann und Neumann[4]), dass die Fähigkeit der Harnstoffgährung (besser »einer stärkeren«) nur einer beschränkten Zahl von Spaltpilzen zukommt, im Allgemeinen wohl als zutreffend anerkannt werden.

Die als Mikrococcen und Bacterien der Harnstoffgährung bezeichneten Harnstoffspalter besitzen diese Fähigkeit jedenfalls in hohem Grade, und wenn auch nicht anzunehmen ist, dass die Zerlegung des Harnstoffes die einzige Veränderung[5]) ist, welche dieselben im faulenden Harn hervorrufen, so ist die Harnstoffzerlegung doch die auffallendste Lebenserscheinung derselben,

1) J. Schnitzler, Zur Aetiologie der Cystitis, Wien 1892 (Braumüller).

2) Hofmeister, Zur Charakteristik des »Eclampsie-Bacillus Gerdes«, Fortschr. d. Med., 1892.

3) Brodmeier, Ueber die Beziehung des Proteus vulg. Hauser zur ammoniakalischen Harnstoffzersetzung. Centr. f. Bact., 18. Bd., 1895, S. 380 ff.

4) Lehmann und Neumann, Atlas und Grundriss der Bacteriologie, München 1896, II. Theil, Text, S. 66.

5) Carpius hat durch Untersuchungen gezeigt, dass gewisse Harnbacterien bei Cultur im Harn auch Schwefelwasserstoff und Methylmercaptan bilden.

ebenso wie die Alkohol- und Kohlensäurebildung diejenige der Hefen. Und wie man den Alkohol und die Kohlensäure als hauptsächlichste Producte des Stoffwechsels der Hefezellen betrachtet, muss man das Ammoniak und die Kohlensäure als vornehmste Producte des Stoffwechsels der Harnstoffspalter ansehen.

Bei dem grossen Interesse, das der Vorgang der Harnstoffzersetzung rein wissenschaftlich, aber auch in Hinsicht darauf, dass die Landwirthschaft mit aus zersetztem Harnstoff hervorgegangenen Stickstoffträgern als Düngemitteln arbeitet, beansprucht, erschien es mir wünschenswerth, den Vorgang der Harnstoffzersetzung durch Bacterien einmal quantitativ zu untersuchen. Es war zu erwarten, dass durch solche Untersuchung die Intensität der Zersetzung sowohl in der Zeiteinheit, als auch für die Einheit der Körpermasse der Bacterien festgestellt werden konnte, und dass damit neue Beiträge zur Kenntnis des Stoffwechsels der Bacterien, vor allem in quantitativer Hinsicht, gewonnen werden könnten, was mir um so wichtiger erschien, als nach dieser Seite hin die Forschung bislang nicht viel ausgedehnt worden ist.

Ursprünglich beabsichtigte ich, die Untersuchung auf die Harnstoffspaltung der bekanntesten Harnstoffspalter auszudehnen, doch musste ich mich schliesslich darauf beschränken, den Vorgang der Harnstoffzersetzung bei einer einzigen Bacterienart zu verfolgen, da schon die ersten Vorversuche eine Reihe von Schwierigkeiten, welche nicht vorauszusehen waren, aufdeckten. Ich konnte ferner auch nicht alle Fragen, welche sich an die im folgenden mitgetheilten Versuchsergebnisse anknüpften, beantworten, da mir die Zeit zur Lösung derselben mangelte, hoffe aber durch die erzielten Resultate wenigstens einige wesentliche Bereicherungen unserer Kenntnisse über den zeitlichen Ablauf und die quantitative Leistung des bacteriellen Stoffwechsels gegeben zu haben.

Verwendet wurde zu den sämmtlichen Versuchen der oben erwähnte, im Laboratorium von Flügge zuerst isolirte Micrococcus ureae liquefaciens, den ich aus Harn, welcher mit Bodenproben oder etwas Schlamm aus der Ablaufrinne eines Pissoirs

beschickt worden war, jederzeit leicht reinzüchten konnte. Zur schnelleren Isolirung bediente ich mich einer mit Lackmustinctur versetzten 10 proc. Harngelatine, deren Bläuung in der Umgebung der auf der Platte sich entwickelnden Colonien die Anwesenheit eines Harnstoffspalters leicht erkennen liess. Uebrigens hat die Colonie des Mikrococcus ureae liquefaciens auf der gewöhnlichen Gelatineplatte ein so charakteristisches Aussehen, dass sie nicht leicht übersehen oder verwechselt werden kann. Die tiefliegenden Colonien heben die Gelatine hügelig auf, und da die Oberfläche des kleinen Hügels das Licht stärker reflektirt, erhalten die Stellen der Platte, unter denen die kugeligen Colonien des Mikrococcus ureae liquefaciens liegen, einen ganz auffälligen Glanz, der die Aufmerksamkeit des Beobachters sofort auf sich zieht. Die oberflächlichen Colonien aber zeichnen sich dadurch aus, dass sie die Gelatine klar und in Form eines Schüsselchens, in dessen Tiefe die weissen kugeligen Colonien liegen, verflüssigen. Dieses charakteristische Aussehen der Colonien hat mir die Auszählung der Platten sehr erleichtert und insbesondere ermöglicht, jede sekundäre Infection der Culturen wie auch Luftinfection der Platten sofort zu erkennen.

Die Anordnung der Versuche war folgende: Sämmtliche Versuche wurden in ca. 500 ccm fassenden Erlenmeyer'schen Kolben angestellt, welche mit einem doppelt durchbohrten Gummipfropfen verschlossen wurden. Durch die eine Bohrung wurde ein Steigrohr bis auf den Boden des Kolbens geführt, das oberhalb des Pfropfens winkelig abgebogen war und ausserhalb des Kolbens bis etwa zur halben Höhe desselben hinabreichte. Durch die andere Bohrung ging ein kurzes Ansatzrohr, durch das die Beschickung des Kolbeninhaltes mit Impfmaterial erfolgen sollte. Die Enden der beiden Rohre wurden mit Wattepfropfen verschlossen. Die Kolben wurden, in dieser Weise montirt, in strömendem Dampf eine Stunde lang sterilisirt. Alsdann wurde die zum Versuch zu benutzende Harnstofflösung nach Lüftung des Pfropfens in den Kolben gebracht und darauf der Kolben mit Inhalt noch einmal eine halbe Stunde im Dampftopf sterilisirt. Ein Theil des Harnstoffs wurde dabei allerdings

zersetzt; doch war dies für meine Versuche belanglos, da ja die Harnstoffbestimmung immer erst unmittelbar nach der Infection ausgeführt zu werden brauchte. Nach dem Erkalten wurde der Kolben zunächst in den Brutschrank verbracht, wo er mehrere Tage blieb, um sicher zu stellen, dass der Inhalt steril war, und alsdann mit einer Aufschwemmung einer Agarcultur des Mikrococcus ureae liquefaciens in sterilem Wasser mittelst einer Pipette oder Glaskapillare beschickt. Der Kolben wurde solange geschüttelt, bis anzunehmen war, dass die Mikrococcen gleichmässig in der Harnstofflösung vertheilt waren, und nunmehr eine Probe des Inhalts durch das Steigrohr ausgeblasen, nachdem zuvor die Mündung des letzteren mit der Flamme erhitzt worden war. Nach der Probeentnahme, die später immer in gleicher Weise wiederholt wurde, wurde das Rohr bis zur Biegestelle stark erhitzt und sogleich mit einem sterilen Wattepfropfen verschlossen. Der Kolben kam nach der ersten Probeentnahme in den auf 37 ° erwärmten Brutschrank, wo er, abgesehen von den kurzen, für die einzelnen Probeentnahmen erforderlichen Fristen, bis zur Beendigung des Versuches verblieb.

Die ausgeblasene Probe wurde in sterilem Kölbchen aufgefangen; sie diente dazu, den Harnstoffgehalt der Flüssigkeit zu bestimmen, und die Zahl der Mikrococcen mittelst des Plattenverfahrens (die Platten wurden mit gewöhnlicher Gelatine und zum Theil auch mit Lackmus-Harngelatine hergestellt) zu vermitteln. Die Auszählung der Platten erfolgte stets so spät, dass ich sicher sein konnte, dass alle Keime, die überhaupt vermehrungsfähig waren, Colonien gebildet hatten, was oft erst nach 6 bis 7 Tagen der Fall war. Die Platten wurden vollständig ausgezählt und, um die Möglichkeit dazu auch später, bei der starken Vermehrung der Keime, noch zu gewährleisten, die Verdünnung der Aussaatprobe möglichst gross gemacht.

Im Ganzen und Grossen gelang die vollständige Auszählung auch immer, wie sich überhaupt die ganze Keimzahlbestimmung sehr einfach gestaltete. Parallelplatten ermöglichten eine gute Controle und zugleich die Gewinnung von Mittelzahlen.

Ich gebe nachstehend ein Beispiel einer solchen Keimzahlbestimmung aus Versuch VI.

0,2 ccm der Probe wurden in 100 ccm sterilen Wassers eingebracht und hievon 0,2 und 0,5 ccm zur Aussaat in Gelatine verwendet. Ferner wurden 0,5 ccm der Verdünnung weiter in 40 ccm sterilen Wassers gegeben und von dieser (2.) Verdünnung 0,5 ccm ausgesäet. Die Auszählung der Platten nach 3 Tagen ergab:

Platte mit 0,5 ccm der 1. Verdünnung 2105 Colonien
Platte mit 0,2 ccm der 1. Verdünnung 863 Colonien
Platte mit 0,5 ccm der 2. Verdünnung 24 Colonien.

Daraus berechnet sich für 1 ccm der Probe[1]) folgender Keimgehalt:

a) in 0,5 ccm der 1. Verdünnung	2 105	Keime
in 100,2 (100 steril. Wasser + 0,2 Probe) .	421 842	»
in 1 ccm der Probe	2 109 210	»
b) in 0,2 ccm der 1. Verdünnung	863	»
in 100,2 ccm der 1. Verdünnung	432 363	»
in 1 ccm der Probe	2 161 815	»
c) in 0,5 ccm der 2. Verdünnung	24	»
in 40,5 ccm (40 steril. Wasser + 0,5 der 1. Verdünnung)	1 944	»
in 1 ccm der 1. Verdünnung	3 888	»
in 100,2 ccm der 1. Verdünnung	389 577	»
in 1 ccm der Probe	1 947 888	»

Mittel: a) 2 109 210 Keime
b) 2 161 815 »
c) 1 947 888 »
= 2 072 971 Keime.

Die Bestimmung des Harnstoffgehaltes der Harnstofflösungen, als welche, nachdem Versuche mit reinen Harnstofflösungen misslungen waren, ausschliesslich Harne in unverdünntem oder

1) Unter der Annahme, dass jede Colonie aus einem Keim hervorgegangen.

verdünntem Zustand mit und ohne die später zu erwähnenden Zusätze dienten, wurde nach der sehr brauchbaren Methode von Mörner und Sjöquist[1]) vorgenommen. Ich habe mich überzeugt, dass diese Methode dieselben Resultate ergiebt, wie die Liebig'sche Titrirmethode; mir erschien erstere, welche unabhängig von der Anwesenheit von Ammoniak arbeitet, die die Liebig'sche Methode unbrauchbar macht, vortheilhafter, da sie auch einfacher ist, wie es mir übrigens auch richtiger erschien nicht den zersetzten Harnstoff mit Hilfe des Ammoniaks zu messen, sondern aus dem Restgehalt der Flüssigkeit zu berechnen[2]). Denn schliesslich ist ja durchaus nicht erwiesen, dass aller zersetzter Harnstoff als kohlensaures Ammoniak vorhanden bleibt.

Berechnet wurde der Harnstoffgehalt procentisch; die Procentzahlen den absoluten gleichzusetzen, halte ich mich deshalb für berechtigt, weil wegen der geringen Querschnitte der Röhren, durch die die Kolben mit der Aussenluft communicirten, die Grösse der Concentration durch Wasserverdunstung aus der Probeflüssigkeit nur unwesentlich sein konnte.

Ich lasse nunmehr nachstehend die Resultate der Versuche mit unverdünntem Harn folgen. Um Wiederholungen zu vermeiden, will ich noch vorausschicken, dass das übereinstimmende Bild des Verlaufs aller Versuche das war, dass der klare Harn im Laufe von 24 Stunden stark trübe wurde und ammoniakalisch roch. Allmählich setzte sich ein immer mächtigeres Sediment, aus Mikrococcen und Krystallen bestehend, ab und schliesslich klärte sich der Harn wieder vollständig, während am Boden des Kolbens eine dicke, weissliche Schicht abgelagert wurde. Selbstverständlich wurde vor jeder Entnahme einer Probe der Kolben möglichst kräftig durchgeschüttelt, damit auch die sedimentirten Keime in die Probe übergingen.

1) Vgl. Handbuch der pysiol. u. pathol.-chem. Analyse von F. Hoppe-Seyler, VI. Aufl., Berlin 1893, S. 356.

2) In seinen Versuchen hat Brodmeier (vgl. a. a. O.) den restirenden Harnstoff ebenfalls direct durch Titrirung nach Liebig-Pflüger bestimmt. Er gibt aber nicht an, wie er den störenden Einfluss des Ammoniaks vermieden hat, was im Interesse der vergleichenden Werthung seiner Ergebnisse zu bedauern ist.

I. Versuch.

Unverdünnter Harn enthielt nach Beschickung mit einer Aufschwemmung des Mikrococcus ureae liquef.

	Harnstoff in %	Keime pro ccm
	1,345	15 531
nach 72 Stunden	1,167	42 720 270
» 144 »	1,051	Platten steril
» 216 »	0,957	ebenso
» 288 »	0,962	ebenso.

II. Versuch.

Unverdünnter Harn, enthielt nach der Infection mit Mikrococcus ureae liquefaciens

	Harnstoff in %	Keime pro ccm
	1,801	22 914
nach 72 Stunden	1,570	53 568 423
» 144 »	1,472	13 926 192.

Versuch II musste am 9. Tag abgebrochen werden, da Sekundärinfection constatirt wurde.

Nach dem Ergebnis dieser beiden Versuche trat innerhalb 72 Stunden eine rapide Vermehrung der Mikrococcen mit messbarer Harnstoffzersetzung ein, die aber sofort in den nächsten Tagen wieder herabging, während gleichzeitig die Zahl der Harnstoffspalter sich verminderte. Auffallend war, dass im I. Versuch die Platten schon nach 144 Stunden steril blieben. Sie blieben sogar steril, als der unverdünnte Harn zur Aussaat gelangte, ein Beweis dafür, dass entweder die Harnstoffspalter abgestorben waren oder ihre Fähigkeit, Harnstoff zu zerlegen, verloren hatten. Dass Ersteres nicht ausschliesslich der Fall war, darüber klärte mich ein Versuch einfachster Art auf. Wurde der klare Harn vorsichtig von dem Sediment abgegossen und dieses mit frischem Harn überschüttet, so trat nach 24 Stunden wieder Trübung des Letzteren mit Ammoniakbildung ein, und nunmehr ergaben Plattenculturen wieder die Anwesenheit zahlreicher Keime. Die Harnstoffspalter waren offenbar in ein Ruhestadium eingetreten.

Gleiche Verhältnisse bieten bekanntlich die Hefen. Da man annimmt, dass die Anreicherung des Alkohols in der vergorenen Würze oder dem Most die Ursache dieses Ruhens der

Gährthätigkeit der Hefenzellen ist, so lag mir die Vermuthung nahe, dass die Anreicherung der Harne an Ammoniak, das ja auch die Reaction der Nährflüssigkeit veränderte, die Ursache der Abminderung der Harnstoffspaltung und des Ruhezustandes der Harnstoffspalter sei. Ich wiederholte daher die Versuche mit einer Modification nach der Richtung hin, dass der Harn verdünnt wurde. Die Anreicherung an Ammoniak konnte in der verdünnten Harnmischung nicht so stark eintreten. Das Ergebnis dieser Versuche war folgendes:

III. Versuch.

Harn mit der gleichen Menge destillirten Wassers verdünnt.

	Harnstoff in %	Keime pro ccm
Nach Beschickung mit Mikroc. ureae liquef.	1,029	11 523
nach 72 Stunden	0,905	894 285
» 144 »	0,692	Platten steril
» 216 »	0,645	ebenso
» 288 »	0,645	ebenso.

IV. Versuch.

Harn mit dem doppelten Volumen destillirten Wassers verdünnt.

	Harnstoff in %	Keime pro ccm
Nach Beschickung mit Mikroc. ureae liquef.	0,719	39 296
Nach 72 Stunden	0,719	12 771 413
» 144 »	0,725	19 566 351
» 216 »	0,721	89 778
» 288 »	0,592 ?	86 325
» 360 »	0,674	—
» 432 »	0,686	28
» 27 Tagen	0,658	156.

V. Versuch.

Harn mit dem doppelten Volumen destillirten Wassers verdünnt.

	Harnstoff in %	Keime pro ccm
Nach d. Beschickung mit Mikroc. ureae liquef.	0,709	nicht genau ermittelt
nach 72 Stunden	0,678	32 801 472
» 144 »	0,610	2 505
» 216 »	0,604	Platten steril
» 288 »	0,593	8.

In Versuch III, wo trotz der Verdünnung der Gehalt des Harns an Harnstoff nur wenig geringer war als bei Versuch I (nämlich 1,03 gegen 1,3) ergab sich fast genau das gleiche wie

bei Versuch I: starke Vermehrung der Keime innerhalb 72 Stunden mit das Maximum der Keimzahl überdauernder Harnstoffzersetzung, dann rasche Abnahme der Keimzahl bei fast constantem Harnstoffgehalt.

Hiergegen wichen die Ergebnisse der Versuche IV und V mit einem Anfangsgehalt der Harnmischung an Harnstoff von 0,719 und 0,709% von den übrigen Versuchsergebnissen nicht unwesentlich ab. Zunächst war bei Versuch IV noch am 6. Tage ein sehr hoher Keimgehalt und am 9. Tage noch ein ansehnlicher Keimgehalt nachzuweisen. Trotz dieses relativ viel höheren Keimgehaltes war aber die Harnstoffzersetzung sehr gering; in den ersten 216 Stunden überhaupt nicht nachweisbar, dann bis höchstens 9% insgesammt ansteigend. In Versuch V erfolgte das Absinken der Keimzahl bei zuletzt fast constantem Harnstoffgehalt etwas langsamer als bei Versuch I und III, nachdem innerhalb 3 Tagen etwa eine starke Vermehrung der Keime und bis zum 6. Tag die Hauptzersetzung des überhaupt zerlegten Harnstoffes erfolgt war.

Man wird nicht fehl gehen, wenn man annimmt, dass dieses unerwartet ungünstige Resultat, dass bei besserem Wachsthum (bis zum 6., ja 9. Tag andauerndem höheren Keimgehalt) die Ge-

Tabelle I.

Versuchs-Nr.	Charakter der Nährlösung	Zahl der Keime im ccm			
		72h	144h	216h	288h
I	Unverdünnter Harn mit 1,34 proc. Harnstoff	15 531	42,7 Mill.	0	0
II	Unverdünnter Harn mit 1,80 proc. Harnstoff	22 914	53,5 Mill.	14 Mill.	—
III	Mit 1 Theil Wasser verdünnter Harn mit 1,03 proc. Harnstoff	11 523	894 285	0	0
IV	Mit 2 Theilen Wasser verdünnter Harn mit 0,72 proc. Harnstoff	39 296	12,7 Mill.	19,5 Mill.	89 778
V	Mit 2 Theilen Wasser verdünnter Harn mit 0,71 proc. Harnstoff	—	32,8 Mill.	2 505	0

sammtleistung der Harnstoffspalter eine viel geringere und durch eine offenbar der Verdünnung zuzuschreibende Verschlechterung des Nährmaterials verursacht war. Unterschiede in der Harnzusammensetzung können dieses Resultat kaum bedingt haben, da die Versuche mit unverdünntem und verdünntem Harn fast gleichzeitig und mit ein und demselben Mischharn aus mehreren Auffangszeiten angestellt wurden.

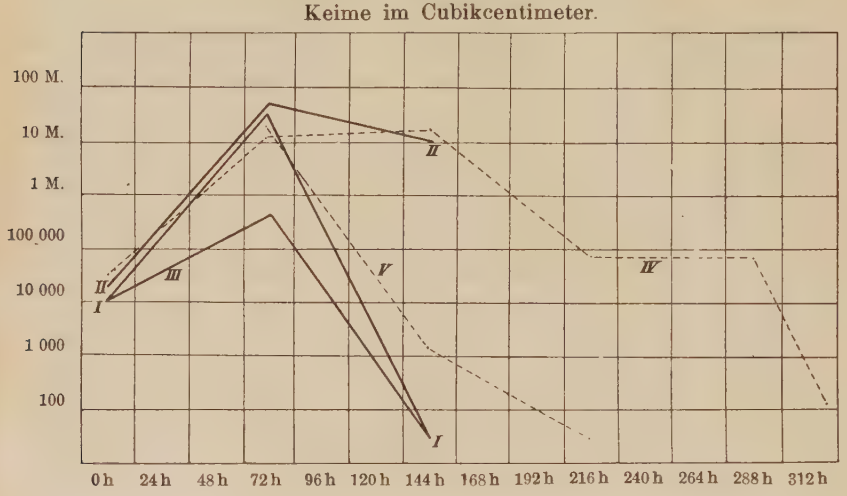
Die Frage nach dem Einfluss der Alkalescenz durch das gebildete Ammoniak konnte aber an der Hand dieser 3 Versuche mit verdünntem Harn nur verneinend beantwortet werden. Denn wenn die ammoniakalische Reaction bei den ersten Versuchen dem Wachsthum und der Lebensthätigkeit der Harnstoffspalter hinderlich war, konnte sie es bei Versuch IV und V jedenfalls nicht in dem Maasse sein, und doch war hier die Lebensthätigkeit, gemessen durch die Grösse der Harnstoffzersetzung, bedeutend geringer. In Versuch III aber, wo sie am intensivsten überhaupt war, war die Wachsthumshemmung vom 3. Tag ab ebenso wie bei Versuch I und II.

Das lässt sich aus der Zusammenstellung der Daten in der folgenden Tabelle, die durch die theilweise graphische Darstellung auf der folgenden Seite ergänzt wird, leicht übersehen.

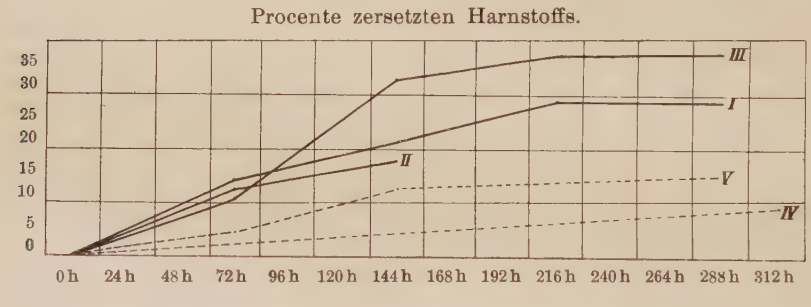
Tabelle I.

Harnstoffgehalt in %				Harnstoffzersetzung in %				Ammoniakgehalt in %			
72h	144h	216h	288h	72h	144h	216h	288h	72h	144h	216h	288h
1,17	1,05	0,96	0,96	13,2	21,9	28,8	28,8	0,09	0,16	0,22	0,22
1,57	1,47	—	—	12,8	18,3	—	—	0,13	0,19	—	—
0,90	0,69	0,61	0,64	12,0	32,8	37,3	37,3	0,07	0,19	0,22	0,22
0,72	0,72	0,72	0,67	0	0	0	7	0	0	0	0,03
0,68	0,61	0,60	0,59	4,4	13,6	14,8	16,4	0,02	0,06	0,06	0,07

Vermehrung des Mikrococcus ureae liquef. in unverdünntem Harn (I u. II) und verdünntem Harn (III, IV, V).



Harnstoffzersetzung durch Mikrococcus ureae liquef. in unverdünntem Harn (I u. II) und verdünntem Harn (III, IV, V).



Nicht unerwähnt möchte ich lassen, dass die Harnstoffabnahme in den Harnen natürlich noch eine Zeit lang, nachdem in den Versuchsprotokollen das Maximum der Keimzahl zu Tage getreten war, andauern musste, auch wenn jetzt schon eine Abnahme der Keimzahl einsetzte, da diese ja nicht plötzlich erfolgte. Bei kürzeren Fristen zwischen den Probeentnahmen würde diese Fortdauer der Harnstoffzersetzung durch die noch höhere Keimzahl deutlich veranschaulicht worden sein; doch konnte ich wegen der gehäuften analytischen Arbeiten bei den gleichzeitig zu mehreren angestellten Versuchen kürzere Fristen nicht wählen.

Es konnte nach diesen Versuchsergebnissen scheinen, als ob die Alkalescenz durch das in der Nährlösung sich anreichernde Ammoniak oder dieses selbst einen das Wachsthum der Mikrococcen hemmenden, vielleicht sogar tödtlichen Einfluss ausübte, da bei den Versuchen mit verdünnten Harnen die Abnahme der Keimzahl nicht so rapid erfolgte. Es konnte aber auch möglich sein, dass in den verdünnten Harnen, welche schlechtere Ernährungsbedingungen boten, das Vermögen der Harnstoffspaltung verringert wurde, wenn auch das Wachsthum weiter ging. Auffällig war immer, dass die noch vorhandenen Harnstoffspalter (vergl. oben S. 9) auf der Platte sich nicht mehr vermehrten. Ich entschloss mich daher zu weiteren Versuchen mit unverdünntem und verdünntem Harn, dem phosphorsaure Magnesia zugesetzt war; der Zusatz sollte bewirken, dass ein Theil des gebildeten Ammoniaks in Form von phosphorsaurer Ammoniakmagnesia, die sich ja auch bei der spontanen Harngährung reichlich absetzt, unlöslich abgeschieden und somit aus der Nährflüssigkeit entfernt wurde.

Die Versuche verliefen folgendermaassen:

VI. Versuch.

Unverdünnter Harn mit einer Messerspitze phosphorsaurer Magnesia versetzt.

Derselbe enthielt nach Beschickg.	Harnstoff in %	Keime im ccm	
mit Mikroc. ureae liquef.	2,149	59 613	
nach 72 Stunden	1,649	2 072 971	
» 144 »	1,093	2 302	
» 216 »	0,717	Platten steril	auch bei directer Aussaat d. Harns.
» 288 »	0,646	ebenso	
» 360 »	0,635	ebenso	
» 432 »	0,642	ebenso	

VII. Versuch.

Unverdünnter Harn mit 1,9 proc. phosphorsaurer Magnesia versetzt.

Derselbe enthielt nach Beschickg.	Harnstoff in %	Keime im ccm
mit Mikroc. ureae liquef.	2,104	—
Nach 72 Stunden	1,495	12 585 034
» 144 »	0,901	552 480
» 216 »	0,615	201 402.
» 288 »	0,469	Platten zeigen eine beginnende Secundärinfection.

VIII. Versuch.

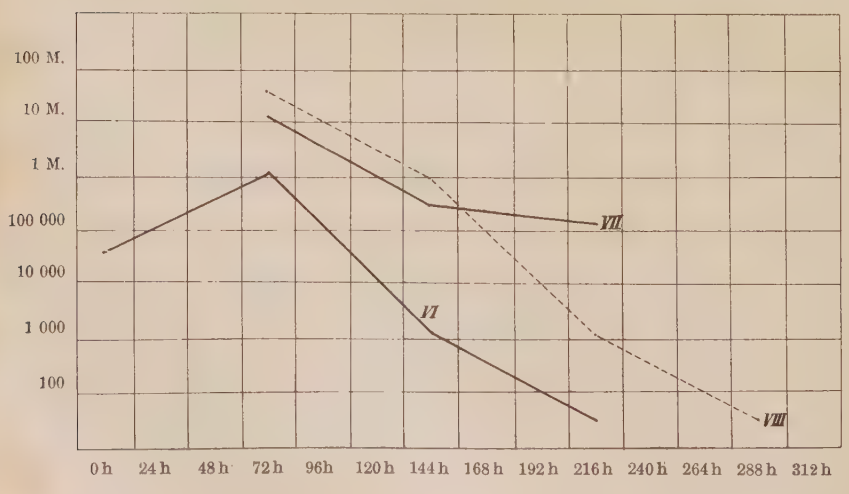
Verdünnter Harn, hergestellt durch Zusatz von zwei Theilen Wasser, versetzt mit 1,3 proc. phosphorsaurer Magnesia.

Derselbe enthielt nach Beschickg.	Harnstoff in %	Keime im ccm
mit Mikroc. ureae liquef	0,778	—
nach 72 Stunden	0,768	62 535 321
» 144 »	0,682	1 129 755
» 216 »	0,670	2 004.
» 288 »	0,658	Platten steril (auch bei directer Aussaat der Harnmischung).

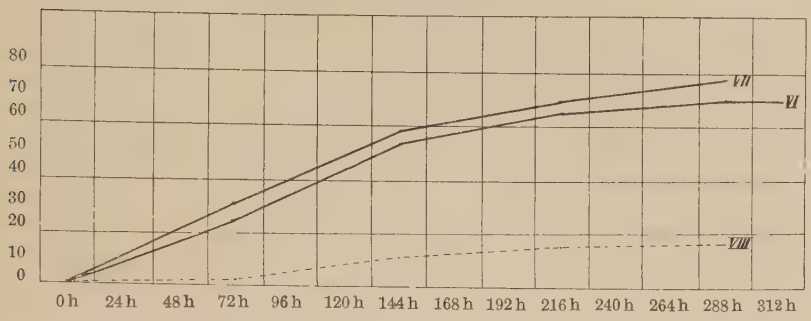
Diese Versuchsergebnisse sind in mehrfacher Weise merkwürdig. Zunächst fällt auf, dass im unverdünnten Harn eine ganz erhebliche Mehrzersetzung von Harnstoff statthatte. Es betrug die Procent-Abnahme an Harnstoff bei

	Versuch VI	Versuch VII	Versuch VIII
nach 72 Stunden	23,3	29,0	1,3
» 144 »	50,9	57,2	12,3
» 216 »	66,6	70,8	13,9
» 288 »	70,0	77,7	15,4
» 360 »	70,0	—	—

Vermehrung des Mikrococcus ureae liquef. in mit phosphorsaurer Magnesia versetztem unverdünntem Harn (VI u. VII) und verdünntem Harn (VIII).



Harnstoffzersetzung durch Mikrococcus ureae liquef. in mit phosphorsaurer Magnesia versetztem unverdünntem Harn (VI und VII) und verdünntem Harn (VIII).



Im verdünnten Harn dagegen war die Zersetzung kaum grösser als bei Versuch IV und V. Aber wiederum ist die Keimzahlvermehrung bei dem Versuch mit verdünntem Harn wie auch die Dauer der Keimzahlerhöhung grösser als bei den Versuchen mit unverdünntem Harn. Es scheint dies doch dafür zu sprechen, dass verdünnter Harn ein schlechteres Nährmedium für die Mikroorganismen ist als unverdünnter. (Vgl. auch die graphische Darstellung.) Die überraschende Erscheinung, dass die im unverdünnten Harn gewachsenen Keime so rasch verschwinden, kann übrigens auch eine Täuschung sein, verursacht dadurch, dass sie nicht mehr auf gewöhnlicher Gelatine auswuchsen — auch auf Harngelatine bildeten sie keine Colonien. Vorhanden sind sie jedenfalls noch, vielleicht in Dauerformen (?).

Sicher ist, dass die Gegenwart der phosphorsauren Magnesia im unverdünnten Harn die Fähigkeit der Keime, Harnstoff zu spalten, steigerte. Ist das eine Wirkung der Bindung des freien Ammoniaks, womit stärkere Alkalescenz der Nährflüssigkeit vermieden wird, oder der Entfernung des Ammoniaks aus der Flüssigkeit durch Bildung des Magnesiumammoniumphosphats? Zur Entscheidung dieser Frage ist zunächst zu berechnen, ob die phosphorsaure Magnesia ausreichte, das Ammoniak vollständig zu binden. Bei Versuch VI, einem orientirenden Vorversuch, wurde die Menge der zugesetzten phosphorsauren Magnesia nicht bestimmt. Die »Messerspitze« enthielt jedenfalls nicht viel des

leichten voluminösen Präparates. Bei Versuch VII wurden zugesetzt 1,9%. Da 131 g phosphorsaurer Magnesia hinreichen, um 17 g Ammoniak zu binden, waren folgende Mengen Ammoniak, welche durch die Harnstoffspaltung gebildet wurden, gebunden worden.

	Menge des zersetzten Harnstoffs für 100 ccm	Menge des entstand. Ammoniaks für 100 ccm	Menge der gebundenen phosphors. Magn. für 100 ccm
nach 72 Stunden	0,609 g	0,347	2,67
» 144 »	1,203 »	0,686	5,28
» 216 »	1,489 »	0,849	6,54
» 288 »	1,635 »	0,932	7,08.

	Menge des gebundenen Ammoniaks für 100 ccm	Menge des verbleibenden freien Ammoniaks für 100 ccm
nach 72 Stunden	0,247	0,100
» 144 »	0,247	0,439
» 216 »	0,247	0,602
» 288 »	0,247	0,685.

Man sieht, dass die gegenwärtige Menge phosphorsaurer Magnesia nicht annähernd ausgereicht hat, das gebildete Ammoniak zu binden. Im Gegentheil ist durch die intensive Harnstoffzersetzung soviel Ammoniak gebildet worden, dass viel höhere Alkalescenzgrade zustande kamen als bei den Versuchen I und II.

Man könnte annehmen, dass die phosphorsaure Magnesia so zersetzt wurde, dass die gleichzeitig mit dem Ammoniak aus dem Harnstoff entbundene Kohlensäure die Magnesia belegt und das Ammoniak die Phosphorsäure gebunden hätte. 262 g phosphorsaure Magnesia würden die Bindung von 51 g Ammoniak gestatten. Aber auch hierbei würde nur 50% Ammoniak mehr neutralisirt worden sein, und schon nach 72 Stunden würde fast alle phosphorsaure Magnesia aufgebraucht gewesen sein.

Schwerlich kann hienach die Alkalescenz die Ursache der geringeren Harnstoffzersetzung der Versuche I und II gewesen sein, noch weniger aber die Gegenwart des Ammoniaks. Hierin bestärkt mich auch ein weiterer Versuch (IX), bei dem dem

Harn (unverdünnt) Gyps[1]) zugesetzt wurde. Der Gyps setzt sich mit dem kohlensauren Ammoniak in der Weise um, dass kohlensaurer Kalk und schwefelsaures Ammoniak, das im Wasser leicht löslich ist, gebildet wird. Bei Gegenwart reichlicher Gypsmengen musste in meinem Versuch überhaupt keine oder nur eine sehr schwache Alkalescenz auftreten. Alles Ammoniak blieb aber in Lösung. Wäre seine Gegenwart für die Entwickelung und Lebensthätigkeit der Harnstoffspalter störend, so müsste dies aus dem Verlauf des Versuches zu erkennen möglich sein.

IX. Versuch.

Unverdünnter Harn mit reichlichem Gypszusatz. Der Gyps bildet im Kolben ein dickes Sediment von mehreren Millimetern Höhe und muss nach der Berechnung ausreichen, alles Ammoniak in Form von schwefelsaurem Ammoniak zu binden.

Der Harn enthielt nach Beschickg.	Harnstoff in %	Keime im ccm
mit Mikroc. ureae liquef.	1,750	14 572
nach 72 Stunden	1,570	22 893 300
» 144 »	1,514	30 060 000
» 216 »	1,349	45 090 045
» 288 »	1,228	15 346 642
» 360 »	1,087	6 277 732
» 432 »	0,946	250 245
» 504 »	0,97	16 080.

Die Wachsthumsförderung des Gypszusatzes ist augenfällig. Das Maximum der Keimzahl wurde erst am 9. Tag erreicht. Am 21. Tag war die Keimzahl noch immer 16 000. Aber die Harnstoffspaltung war diesem guten Wachsthum der Mikrococcen nicht entsprechend. Es betrug die procentische Abnahme des Harnstoffs

		Diff.
nach 72 Stunden	10,0	
		Diff. 3,5
» 144 »	13,5	
		» 9,4
» 216 »	22,9	
		» 7,1
» 288 »	30,0	
		» 7,9
» 360 »	37,9	
		» 8,0
» 432 »	45,9	
		» 0.
» 504 »	45,9	

1) Die Landwirthe verwenden häufig Gyps als Zusatz zur Jauche, um das Ammoniak zu binden und so die Verluste durch das Entweichen gasförmigen Ammoniaks zu verhindern.

Was aber bei den bisherigen Versuchen niemals zu constatiren war, ist hier zu constatiren, nämlich eine gewisse Constanz der Zersetzung, nachdem zur Zeit der grössten Keimzahl ein Höhepunkt der Zersetzung erreicht war.

Ein Gift für den Harnstoffspalter ist das Ammoniak daher nicht.

Welche Rolle die phosphorsaure Magnesia und der Gyps bei der Harnstoffspaltung durch Mikrococcus ureae liquefaciens spielen, kann ich nach diesen wenigen Versuchen nicht sagen. Vielleicht sind sie gute Nährsalze, vielleicht Reizmittel für die Harnstoffspalter wie das Kochsalz für die Choleravibrionen. Eine Entscheidung werden wohl die weiteren Versuche, die jetzt im Institut fortgesetzt werden, bringen.

Als wesentliches Ergebnis der mitgetheilten Versuche möchte ich das betrachten, dass gezeigt werden konnte, in welch hohem Grad durch Concentration des Nährmittels und durch bestimmte Salze das Wachsthum und die harnstoffspaltende Thätigkeit des Mikrococcus ureae liquefaciens beeinflusst werden kann.

Aehnliches vermochte auch Brodmeier[1]) für den Proteus Hauser darzuthun. Doch wurde bei seinen Versuchen das Wachsthum der Keime nicht zahlenmässig belegt, sondern nur als gut oder schlecht abgeschätzt, und ausserdem währten seine Versuche höchstens 24 Stunden.

Auf der Tabelle II auf Seite 21 habe ich die Ergebnisse der Brodmeier'schen Versuche zusammengestellt.

Bei Zusatz von 1—5% Traubenzucker zur Harnstofflösung erfolgte zwar Wachsthum, aber keine Harnstoffzersetzung.

Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass saure Reaction und Salze wie Mg SO_4 die Thätigkeit und Vermehrung des Proteus hemmten, alkalische Reaction und andere Salze (Kochsalz) sowie Peptone sie förderten. Der hemmende Einfluss des Mg SO_4 wurde aber weit übertroffen durch den fördernden guter Nährmittel (Peptone) (siehe Vers. VII u. XI).

1) a. a. O.

Tabelle II.

	Versuch I. 1 proc. Harnstofflösung, neutral		Versuch II. 1 proc. Harnstofflösung, schwach alkalisch		Versuch III. 1 proc. Harnstofflösung, schwach alkalisch		Versuch IV. 1 proc. Harnstofflösg. schwach alkalisch mit 1 proc. Pepton		Versuch V. 1 proc. Harnstofflösung mit $^1/_2$ proc. Na Cl			
									a) sauer		b) alkalisch	
	Wachsth.	Zers. Harnstoff in %	Wachsth.	Zers. Harnstoff in %	Wachsth.	Zers. Harnstoff in %	Wachsth.	Zers. Harnstoff in %	Wachsth.	Z. Harnstoff in %	Wachsth.	Z. Harnstoff in %
Nach 6 Stunden	—	—	—	—	—	—	‚gut'	—	—	—	‚gut'	—
» 12 »	—	—	—	9,08	—	—	—	—	—	—	—	—
» 18 »	—	—	—	—	—	—	—	—	sichtbar	—	—	—
» 24 »	—	8,35	—	—	—	11,47	—	13,11	—	6,12	—	12,68

	Versuch VI. 1 proc. Harnstofflösung mit 0,1 proc. sauren phosph. Natrium		Versuch VII. 1 proc. Harnstofflösung mit 0,1 proc. $MgSO_4$ React. neutral		Versuch VIII. 1 proc. Harnstofflösung mit 1 proc. Pepton und 0,5 proc. Na Cl, neutral		Versuch IX. 1 proc. Harnstofflösg. mit 1 proc. Pepton u. 0,5 proc. Kochsalz, schwach alkal.	
	Wachsth.	Zers. Harnstoff in %	Wachsth.	Zers. Harnstoff in %	Wachsth.	Zers. Harnstoff in %	Wachsth.	Zers. Harnstoff in %
Nach 6 Stunden	—	—	—	—	—	—	‚gut'	—
» 12 »	—	—	—	—	—	—	—	—
» 18 »	—	—	—	—	—	—	—	16,77
» 24 »	0	0	—	6,95	—	15,00	—	—

	Versuch X. 1 proc. Harnstofflösung mit 0,5 proc. Kochsalz u. 0,02 proc. Harnsäure, schwach alkal.		Versuch XI. 1 proc. Harnstofflösung mit 1 proc. Pepton, 0,5 proc. Kochsalz, 0,1 proc. $MgSO_4$				Versuch XII. 1 proc. Harnstofffl. m. 0,5 proc. Kochs., 0,1 proc. $MgSO_4$ u. 0,1 proc. sauren phosph. Natrons			
			a) neutral		b) schwach alkal.		a) sauer		b) schwach alkal.	
	Wachsth.	Zers. Harnstoff in %	Wachsth.	Zers. Harnstoff in %	Wachsth.	Zers. Harnstoff in %	Wachsth.	Zers. Harnstoff in %	Wachsth.	Zers. Harnstoff in %
Nach 6 Stunden	—	—	‚mässig'	—	‚gut'	—	—	—	—	—
» 12 »	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
» 18 »	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
» 24 »	—	10,05	—	13,88	—	19,10	0	0	—	5,02

Ich möchte sodann auf Grund obiger Versuchsresultate noch darlegen, wie gross die stoffliche Leistung des Mikrococcus ureae liquefaciens bei meinen Versuchen war, und wie rasch die Vermehrung derselben, wenigstens anfänglich, erfolgte. Für diese Darlegung ist als Voraussetzung zu nehmen, dass die Vermehrung der Keime bis zum (beobachteten) Höhepunkt der Keimzahl in regelmässiger (geometrischer) Progression vor sich ging, und dass ebenso die Harnstoffzersetzung in geometrischer Folge sich steigerte, ferner dass der Harnstoff ausschliesslich in kohlensaures Ammoniak zersetzt wurde und nicht etwa ein grösserer Theil desselben zum Aufbau der Mikrococcenzellen diente.

Verwendbar für diese Darlegungen sind die Versuche I, II, III, IV, VI, IX, bei welchen der Anfangsgehalt der Harne an Keimen ermittelt wurde.

Versuch	Anzahl der Keime pro ccm		Harnstoff innerhalb 72 Stunden zersetzt pro ccm in mg
	zu Beginn	nach 72 Stunden	
I	15 531	42 720 270	1,78
II	22 914	53 568 423	2,31
III	11 523	894 285	1,24
IV	39 296	12 771 413	0
VI	59 613	2 072 971	5,0
IX	14 572	22 893 300	1,8

Daraus berechnet sich folgende mittlere Keimzahl und mittlere Zersetzungsgrösse für 1000 Keime und folgende Vermehrungsgeschwindigkeit (Zeit zur Theilung).

Versuch	Mittlere (geometr.) Keimzahl während 72 Stunden	Harnstoffzersetzung während 72 Std. mg	Zersetzungsgrösse von 1000 Keimen mg	Zersetzungsgrösse von 1000 Keimen pro Stunde mg	Mittlere Theilungszeit eines Keimes in Stunden
I	814 548	1,78	0,0 022	0,00 003	6,3
II	1 107 910	2,31	0,0 021	0,00 003	6,5
III	101 513	1,24	0,0 122	0,00 017	11,6
IV	—	0	0	0	8,8
VI	351 534	5,0	0,0 142	0,00 02	14,4
IX	577 582	1,8	0,0 031	0,00 0043	7,0

Die mittlere Zersetzungsgrösse für 1000 Keime schwankte, ebenso wie die Theilungszeit nicht unerheblich, erstere fast um das 6—7fache, letztere um fast das Doppelte. Eine gewisse Gesetzmässigkeit lässt sich bei diesen Schwankungen nicht verkennen, insofern nämlich einer grösseren Theilungszeit eine bedeutend grössere Zersetzung entsprach. Je schneller die Theilung vor sich ging, desto weniger wurde zersetzt, und es sieht fast so aus, als ob die Zersetzung geringer würde, wenn die Vermehrung eine besonders rege wäre. Sollte sich die Erscheinung bestätigen lassen und auch bei anderen Spaltpilzen nachzuweisen sein, so würde damit auf die Lebensvorgänge im Spaltpilzkörper ein neues Licht geworfen.

Ich hätte gerne die Zersetzungsgrösse für die Gewichtseinheit der Spaltpilzmasse berechnet, konnte aber leider keine so üppigen Culturen des Mikrococcus ureae liquefaciens auf festen Nährsubstraten erzielen, um eine annähernd genaue Bestimmung der auf die Gewichtseinheit entfallenden Keimzahl vorzunehmen. Um wenigstens eine Vorstellung von der Leistung des Mikrococcus ureae liquefaciens nach Körpermasse zu machen, will ich mich der von v. Nägeli[1]) gemachten Angabe bedienen, dass von den kleinen Spaltpilzen im trockenen Zustande etwa 30 Billionen auf 1 g entfallen; bei einem durchschnittlichen Wassergehalt der Spaltpilzzellen von 80%, würden etwa 6 Billionen Spaltpilze in feuchtem Zustand auf 1 g kommen. Da 1000 Zellen von Mikrococcus ureae liquefaciens in 1 Stunde 0,00003 — 0,0002 mg Harnstoff zerlegt haben, würde 1 g Körpermasse des Mikrococcus in wasserhaltigem Zustand in der Stunde 180 g — 1200 g Harnstoff zu zersetzen befähigt gewesen sein, 1 kg also 180 — 1200 kg, fürwahr eine gute Stoffwechselleistung, aus der sich auch ersehen lässt, welche Bedeutung im Haushalt der Natur diesen kleinen Lebewesen zukommen kann.

1) C. v. Nägeli, Die niederen Pilze. München 1877, S. 7.